

# Vektoren zur Transfektion von eukaryotischen Zellen, deren Verwendung und damit transfizierte Zielzellen

Patent number: DE19514310

Publication date: 1996-10-24

Inventor: KULMBURG PETER DR (DE); ROSENTHAL FELICIA DR (DE); LINDEMANN ALBRECHT DR (DE); VEELKEN HENDRIK DR (DE); MERTELSMANN ROLAND PROF DR (DE)

Applicant: UNIV LUDWIGS ALBERT (DE)

Classification:

- international: C12N15/79; C12N5/10; A61K48/00; C12N15/85; C12N15/19

- european: C07K14/535; C07K14/55; C12N15/67; C12N15/79; C12N15/85

Application number: DE19951014310 19950418

Priority number(s): DE19951014310 19950418

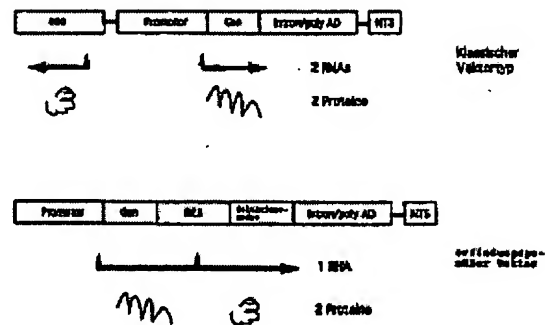
Also published as:

WO9633272 (A1)

Report a data error here

## Abstract of DE19514310

The invention relates to cloning vectors for eucaryotic cells comprising an expression cassette in which the transgene is arranged behind the regulating component and the transgene is followed by an internal ribosome entry sequence and a selection gene. These vectors are suitable for the transfection of eucaryotic cells usable in gene therapy.



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 14 310 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 N 15/79**  
C 12 N 5/10  
A 81 K 48/00  
C 12 N 15/85  
// C12N 15/19

②1 Aktenzeichen: 195 14 310.8  
②2 Anmeldetag: 18. 4. 95  
④3 Offenlegungstag: 24. 10. 96

DE 195 14 310 A 1

⑦1 Anmelder:  
Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,  
79106 Freiburg, DE

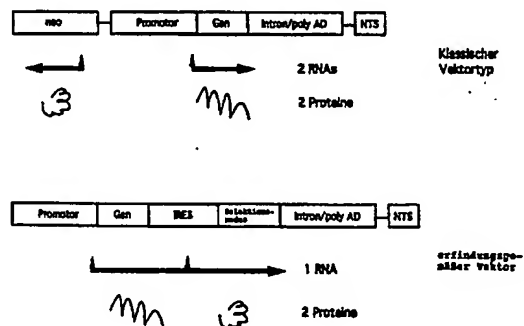
⑦4 Vertreter:  
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

⑦2 Erfinder:  
Kulmburg, Peter, Dr., 79110 Freiburg, DE; Rosenthal,  
Felicia, Dr., 79102 Freiburg, DE; Lindemann,  
Albrecht, Dr., 79294 Sölden, DE; Veelken, Hendrik,  
Dr., 79110 Freiburg, DE; Martelsmann, Roland, Prof.  
Dr., 79104 Freiburg, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht zu ziehende Druckschriften:  
EP 05 85 983 A2  
WO 94 24 870 A1  
Chemical Abstracts: Vol.122, 1995, Ref. 97695d;  
Vol.121, 1994, Ref. 28592k;  
Vol.121, 1994, Ref. 2113e;

⑤4 Vektoren zur Transfektion von eukaryotischen Zellen, deren Verwendung und damit transfizierte Zielzellen

⑤7 Offenbart werden Klonierungsvektoren für eukaryontische Zellen, die eine Expressionskassette umfassen, bei der das Transgen hinter dem regulatorischen Element angeordnet ist und das Transgen gefolgt wird von einer internen Ribosomen-Eintrittsequenz und einem Selektionsgen. Diese Vektoren eignen sich zur Transfektion von eukaryotischen Zellen, die bei der Gentherapie Verwendung finden können.



DE 195 14 310 A 1

## Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, die dazu dienen, zellfremde DNA in eukaryotische Zellen, insbesondere Vertebratenzielzellen, einzuschleusen, um die auf dieser zellfremden DNA kodierte Information möglichst effizient zu exprimieren.

Um die Zielzellen dazu zu bringen, ein fremdes Genprodukt zu exprimieren, muß die DNA zunächst in die Zielzellen eingebracht werden. Hierzu kann Plasmid-DNA mittels Transfektion, beispielsweise durch Elektroporation, Lipofektion, Kalciumpräzipitation oder Partikelbeschluß in die Zielzellen eingebracht werden.

Eine andere Möglichkeit, die Fremd-DNA in die Zielzellen einzubringen, ist die Verwendung von Retroviren, bei denen die DNA in ein Protein eingehüllt ist. Im Fall der Retroviren wird die DNA stabil in das Genom sich teilender Zellen eingebaut.

Bei der Verwendung von Plasmiden wird die Fremd-DNA nur bei einem geringen Teil der Zellen, die die Fremd-DNA aufgenommen haben, auch wirklich ins Genom eingebaut.

Der DNA-Transfer mittels Retroviren ist zwar effizienter, birgt aber auch größere biologische Gefahren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Vektoren, die den Plasmidvektoren zuzurechnen sind, deren Verwendung und damit transfizierte Zielzellen.

Es ist bekannt, daß die Transfektionseffizienz bei Plasmidvektoren zu wünschen übrig läßt. Auch die Expression des von der zellfremden DNA kodierten Gens, das im folgenden als Transgen bezeichnet wird, ist häufig nicht zufriedenstellend. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Vektoren bereitzustellen, die diese Nachteile überwinden.

Die Effizienz eines Transfektionsvektors wird durch seine Bestandteile und das Zusammenwirken dieser Bestandteile maßgeblich bestimmt. Ein wesentlicher Bestandteil von Transfektionsvektoren ist ein Selektionsmarker, der es erlaubt, die transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden. Meist handelt es sich hierbei um ein Gen, dessen Genprodukt Resistenz gegen ein Antibiotikum bewirkt. Nach Transfektion können dann nur solche Zellen wachsen, die dieses Genprodukt (Resistenz) erfolgreich produzieren. Für Vertebratenzellen wird häufig das Neomycin-Resistenzgen ("neo") verwendet.

Weiterhin weisen Vektoren regulatorische Sequenzen auf, die die Transkription und Translation des Genproduktes, das in der Zielzelle erzeugt werden soll, steuern.

Außerdem weisen Vektoren solche genetischen Elemente auf, die zur Vermehrung des Vektors erforderlich sind.

Schließlich besitzt ein Transfektionsvektor das Gen, das in den Zielzellen zur Expression gebracht werden soll. Dieses Transgen wird wegen seinem Genprodukt in die Zielzelle eingebaut. Wenn das Transgen für einen Wachstumsfaktor bzw. ein Zytokin oder ein anderes therapeutisch relevantes Protein kodiert, kann die entsprechend transfizierte Zelle auch bei der Gentherapie verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Vektoren zur Transfektion von Zellen, die eine Expressionskassette mit mehr als einem Cistron aufweisen, die in Richtung vom 5'-Ende zum 3'-Ende folgende Bestandteile aufweisen:

a) wenigstens ein regulatorisches Element;

- b) wenigstens ein zu exprimierendes Gen;
- c) wenigstens eine interne Ribosomen-Eintrittssequenz (IRES);
- d) wenigstens ein Selektionsgen.

Das regulatorische Element (a) kann einen Promotor umfassen, der bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CMV-Promotor und  $\beta$ -Aktinpromotor. Weiterhin kann das regulatorische Element weitere verstärkend wirkende Bestandteile (sog. "enhancer") aufweisen.

Bei dem zu exprimierenden Gen (b) handelt es sich bevorzugt um Gene, die kodieren für Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Granulocyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), Granulocyten-Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF), Erythropoetin (EPO), Stammzellfaktor (SCF), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) oder Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Es ist jedoch auch möglich, andere Gene zur Expression zu bringen, beispielsweise das "green fluorescent protein" oder die  $\beta$ -Galactosidase.

Wesentlich ist, daß der erfindungsgemäße Vektor eine interne Ribosomeneintrittssequenz (IRES) (c) aufweist, die in bevorzugter Ausführungsform ausgewählt ist aus den internen Ribosomeneintrittssequenzen, die ursprünglich aus Picornaviren oder dem Encephalomyocarditis-Virus herkommen.

Die erfindungsgemäßen Vektoren weisen ein Selektionsgen (d) auf, das bevorzugt ausgewählt ist aus Resistenzgenen gegen Antibiotika, insbesondere dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen und dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform weist der erfindungsgemäße Vektor ein Selektionsgen auf, das cDNA des Thymidin-Kinase-Gens von Herpes simplex, fusioniert an DNA, kodierend für Neomycin-Phosphotransferase oder Hygromycin-Phosphotransferase umfaßt. In einer dieser bevorzugten Ausführungsformen weist das chimäre Gen die gesamte für die Neomycinresistenz kodierende DNA und die gesamte cDNA kodierend für das Thymidin-Kinase-Gen auf, wobei diese beiden Gene durch ein "Scharnier" miteinander verbunden sind. Bei diesem Scharnier handelt es sich vorzugsweise um eine kurze Aminosäuresequenz, die besonders bevorzugt durch vier Glycinreste gebildet wird.

Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Vektoren in bevorzugter Ausführungsform in Transkriptionsrichtung nach dem Selektionsgen einen Genbereich Intron/poly AD auf. Der bei den erfindungsgemäßen Vektoren bevorzugt verwendete Abschnitt "Intron/poly AD" entstammt dem Virus SV40 und enthält dessen kleines Intron und eine sehr effiziente Polyadenylierungsstelle. Bekanntermaßen sind Introns kleine Abschnitte in der DNA und der primären RNA, die die kodierenden Teile der Nukleinsäuren unterbrechen. Im Zuge der Reifung der RNA werden diese Introns entfernt (Spleißen), so daß nur die kodierenden Bereiche der RNA übrig bleiben.

Es hat sich herausgestellt, daß für eine effiziente Expression von Transgenen ein mindestens einmaliges Spleißen der RNA vorteilhaft ist. Daher kann in einer bevorzugten Ausführungsform im  $\beta$ -Aktinpromotor ein weiteres Intron vorhanden sein, und zwar am Ende des  $\beta$ -Aktinpromotors.

Die Polyadenylierungsstelle am Ende einer Trans-

kriptionseinheit dient dem Abschluß der RNA-Polymerase II-Tätigkeit und gibt so die Stelle an, an der die Transkription zu beenden ist. Die Polyadenylierungsstelle bildet, meist verbunden mit einer AATAAA-Sequenz die Stelle, an der der sogenannte Poly-Adenosin-Schwanz an die unreife RNA angehängt wird. Dieser Poly-A-Schwanz dient wahrscheinlich der Stabilität der RNA und ist ein Zeichen für reife eukaryontische Messenger-RNA.

Schließlich weisen die erfindungsgemäßen Vektoren in bevorzugter Ausführungsform am 3'-Ende des Konstruktes eine NTS-Sequenz auf. In bevorzugter Ausführungsform ist die NTS-Sequenz eine kurze murine DNA-Sequenz mit etwa 50 Basenpaaren langen AT-reichen Anteilen. Ursprünglich stammt diese Sequenz aus rDNA-Cistrons im Bereich der RNA-Polymerase I Transkriptions-Startstelle. Wenn diese Sequenz in Plasmide integriert wird und mit diesen Vektoren murine Zellen transfiziert werden, kommt es zu einer Amplifizierung der Vektor-DNA. Letztere wird dann, in hoher Kopienzahl im Genom integriert, wiedergefunden. Für die Transfizierung von humanen Zellen können entsprechende humane NTS-Sequenzen Verwendung finden.

Die erfindungsgemäßen Vektoren weisen eine Expressionskassette mit mehr als einem Cistron auf; bevorzugt sind dicistronische Expressionskassetten. Unter einem Cistron versteht man einen DNA-Bereich, der für eine bestimmte Polypeptidkette kodiert. Erfindungsgemäß kodiert eine Expressionskassette wenigstens für zwei Polypeptide, nämlich das Transgen und das Genprodukt des Selektionsgens.

Gegenstand der Erfindung sind auch eukaryotische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert wurden.

Bei den eukaryotischen Zellen handelt es sich in bevorzugter Ausführungsform um humane Zellen, die besonders bevorzugt ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend Fibroblasten, Knochenmarksvorläuferzellen, Vorläuferzellen von weißen Blutkörperchen, Langerhans'sche Zellen und dendritische Zellen.

Erfindungsgemäß verwendet werden können die Zellen zur Expression von Genen in vitro, aber auch zur Expression von Genen in vivo, wobei bevorzugt die transfizierten Zellen Patienten verabreicht werden und die Zellen das klonierte Gen im Patienten exprimieren.

Eine andere Verwendung der erfindungsgemäßen transfizierten eukaryontischen Zellen bietet die Anwendung bei Nutztieren. Die erfindungsgemäßen Vektoren können dazu verwendet werden, eukaryotische Zellen, die bevorzugt von dem jeweiligen Nutztier stammen, zu transfizieren.

Als Ausgangsmaterial können bevorzugt von dem jeweiligen Tier herkommende Fibroblasten, Knochenmarksvorläuferzellen, Vorläuferzellen von weißen Blutkörperchen, Langerhans'sche Zellen oder dendritische Zellen verwendet werden. Diese Zellen werden dann mit dem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert. Der erfindungsgemäße Vektor beinhaltet dann das gewünschte Transgen. Je nach dem erzielten Zweck kann es sich hierbei um ein entsprechendes Gen handeln. Es ist beispielsweise denkbar, das geeignete Wachstumshormon auf diesem Weg in Tiere einzubringen, die zur Fleischproduktion angezogen werden. Dadurch kann ein schnelleres Wachstum erzielt werden. Eine andere Anwendungsmöglichkeit besteht bei Labortieren. Bei Labortieren kann auf diese Art und Weise ein Transgen eingeführt werden, ohne daß es erforderlich ist, die Keimbahnen der Tiere zu verändern (transgene Tiere).

Besonders vorteilhaft ist bei dieser Anwendung, wenn ein Vektor verwendet wird, der ein "suizid"-Gen aufweist. Dadurch kann die Expression des Transgenes zu dem gewünschten Zeitpunkt abgeschaltet werden.

In Abb. 1 ist der Unterschied zwischen einem bevorzugten erfindungsgemäßen Vektor und dem klassischen Vektortyp schematisch dargestellt. Bei dem aus dem Stand der Technik bekannten klassischen Vektortyp wird die Expression des Transgens unabhängig von der Expression des Resistenzmarkers (hier: neo) gesteuert, weshalb auch zwei verschiedene Promotoren zur Regulierung der Expression verwendet werden müssen.

Im Unterschied hierzu sind bei dem erfindungsgemäßen Vektor sowohl das Transgen wie auch das Selektionsgen zu einer großen Kassette verbunden, bei der sowohl das Transgen wie auch das Selektionsgen von einem einzigen Promotor kontrolliert werden.

Die Einfügung der IRES-Sequenz zwischen dem Transgen und dem Selektionsmarker erlaubt eine Wiederaufnahme der Translation der gemeinsamen mRNA durch die Ribosomen am Ende der IRES-Sequenz. Üblicherweise würde in eukaryontischen Zellen die Translation nach dem Stoppkodon in der cDNA des Transgens abbrechen und damit die Translation des Selektionsmarkers vereiteln. Die IRES-Sequenz ist viralen Ursprungs und bildet eine RNA-Hyperstruktur aus, die von Ribosomen als (neuer) Translationsstartpunkt erkannt wird, so daß trotz des Stoppkodons am Ende des Transgen-Abschnitts hinter der IRES-Sequenz weitere Proteine translatiert werden können.

Grundsätzlich wäre es auch möglich, hinter oder auch vor das Selektionsgen eine weitere IRES-Sequenz einzubauen und an diese weitere IRES-Sequenz ein weiteres Gen anzubinden. Dadurch könnten zusätzliche Gene in multicistronischen Expressionskassetten kloniert werden und es könnten mehrere Proteine zur Expression gebracht werden. Dies kann insbesondere dann eine Rolle spielen, wenn bei der Gentherapie mehrere Genprodukte in Zielzellen eingebracht werden sollen und diese Genprodukte gleichzeitig exprimiert werden sollen.

Die interne Ribosomen-Eintrittssequenz (IRES) wurde bei mehreren Picorna-Viren aufgefunden. Die IRES bewirkt, daß für die Translation der mRNA die RNA nicht mit einer Kappe versehen sein muß.

An das Selektionsgen schließt sich üblicherweise ein Bereich Intron/poly AD an.

In bevorzugter Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Vektoren am 3'-Ende, also am "hinteren" Ende des Konstrukts die sogenannte NTS-Sequenz auf. Die NTS-Sequenz hat einen positiven Einfluß auf die Transkription des Konstrukts durch Veränderung der lokalen Chromosomenstruktur und kann so zur Amplifizierung des Konstrukts beitragen.

Die erfindungsgemäßen Vektoren weisen am 5'-Ende, also dem "vorderen" Ende, wenigstens ein regulatorisches Element auf. Bei den regulatorischen Elementen handelt es sich in bevorzugter Ausführungsform um Promotoren, wobei besonders bevorzugt der sogenannte CMV-Promotor oder der Human- $\beta$ -Aktin-Promotor verwendet wird. Der CMV-Promotor ist ein sehr starker Promotor, mit dessen Hilfe in Zellkultur hohe Mengen an Transgen, beispielsweise G-CSF produziert werden konnten. Bei Tierversuchen wurde allerdings ermittelt, daß dieser Promotor schnell wieder abgeschaltet wurde, wenn die mit dem erfindungsgemäßen Vektor veränderten Zellen in Mäuse transplantiert wurden.

Der erfindungsgemäß bevorzugt verwendete humane

$\beta$ -Aktin-Promotor wird nach der Rückführung der transfizierten Zellen erst wesentlich später abgeschaltet (mehr als 10 Tage). Verglichen mit dem CMV-Promotor hat der  $\beta$ -Aktin-Promotor in humanen Fibroblastenzellen allerdings nur etwa 50% der Aktivität des CNV-Promotors. In Abhängigkeit von dem beabsichtigten Verwendungszweck muß daher ein entsprechend geeigneter Promotor verwendet werden. Zusätzlich zu dem Promotor können noch weitere, die Transkription verstärkende Elemente, sogenannte Enhancer, eingebaut werden.

Als Selektionsgen kann ein Gen verwendet werden, dessen Genprodukt Resistenz gegenüber Antibiotika bewirkt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Selektionsgen ein Fusionsgen aus dem Gen für Thymidinkinase und dem Gen, das Resistenz gegenüber Neomycin bewirkt. Die Koexpression des Thymidinkinase-Gens, das von Herpes simplex-Virus stammt, erlaubt es, Zellen, die die Thymidinkinase exprimieren, durch Gancyclovir (GCV) selektiv abzutöten. Wenn also die erfindungsgemäßen Vektoren dazu verwendet werden, Zellen zu transfizieren, die bei der Gentherapie Verwendung finden, ist es wünschenswert, ein Mittel an der Hand zu haben, diese Zellen auch wieder gezielt abzutöten. Dies ist bei Verwendung des erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzten Fusionsprotein durch die parenterale Applikation von Gancyclovir möglich. Derartige "Suizid"-Gene werden bei den erfindungsgemäßen Vektoren besonders bevorzugt verwendet, da es möglich sein muß, genetisch manipulierte Zellen bei der Gentherapie auch wieder abzuschalten. Es konnte auch experimentell gezeigt werden, daß die transfizierten Zellen in vivo wieder abgeschaltet werden können.

Die erfindungsgemäßen Vektorkonstrukte sind verhältnismäßig groß. Daher ist es nicht immer leicht, die entsprechenden Transgene einzuklonieren. Erfindungsgemäß wurden daher weitere Konstrukte entwickelt, die nur Teile des Gesamtkonstrukts beinhalten. Wie Abb. 2 schematisch zeigt, ist es möglich, nur Teile des GMV-Promotors bzw. des  $\beta$ -Aktin-Promotors und das zu klonierende Gen (hier hu G-CSF) zu verwenden. Derartige Teilvektoren erlauben ein einfaches Ersetzen des zu exprimierenden Gens (hier hu G-CSF) durch eine gewünschte neue Sequenz, welche im Anschluß über zwei singuläre Schnittstellen (hier dargestellt als E, B) in das Gesamtkonstrukt umklont werden kann. Ohne Probleme kann dies beispielhaft am  $\beta$ -Galactosidase-Gen gezeigt werden.

Abb. 3 zeigt einen anderen Vektor, bei dem das zu exprimierende Gen das Markergen GFP (Green fluorescent protein) ist. Die Besonderheit dieses Vektors kann darin gesehen werden, daß der Vektor singuläre Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, nämlich Pst I und BamH I aufweist, über die andere Transgene einkloniert werden können, so daß dieser Vektor in der Praxis hervorragend verwendet werden kann. Auch ein schneller Austausch von Promotoren ist bei diesem Vektor möglich. Die Verwendung der singulären Restriktionsschnittstelle Pst I hat den Vorteil, daß sie kompatibel ist mit DNA-Enden, die erzeugt wurden durch die Restriktionsendonucleasen Xma I, SgrA I, Eco56 I, Cfr101 oder BseAI. BamH I ist kompatibel mit Fragmenten, die erzeugt wurden durch Bgl II oder Bcl I. Mit dem Einsatz von GFP in dem Vektor besteht die Möglichkeit, bequem zu testen, ob der Vektor für die beabsichtigten Einsatzzwecke geeignet ist.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Vektoren

wurde in den nachfolgenden Beispielen überprüft. Bei den nachfolgenden Beispielen wurden verschiedene Vektortypen miteinander verglichen. Bei der Testung der G-CSF Produktion wurden jeweils die gleichen Vektortypen einmal mit und einmal ohne NTS-Sequenz verglichen. Für die in Abb. 6 aufgeführten Werte wurde der klassische Vektor (mit zwei Promotoren) verwendet, wohingegen Abb. 7 Ergebnisse zeigt, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor erhalten wurden.

Durch die nachfolgenden Beispiele soll einerseits der Einfluß der NTS-Sequenz gezeigt werden, um einen singulären Effekt z. B. nur auf den CMV-Promotor auszu-schließen. Weiterhin wurden erfindungsgemäße Vektoren mit herkömmlichen Vektorkonstruktionen verglichen, aus denen sich ergibt, daß der erfindungsgemäße Vektor wesentlich mehr G-CSF bildet.

#### Beispiel 1

##### Transfektionseffizienz

Der erste Schritt bei der Testung eines Transfektionsvektors besteht darin zu untersuchen, in welchem Ausmaß und in welcher Güte der Vektor seine Information in die Zielzelle einbringen kann. Als Maß hierfür mag die Bestimmung der Transfektionseffizienz dienen, d. h. wie viele Zielzellen enthalten nach dem Versuch den Vektor und exprimieren (zumindest) das Markergen. Bei der vorliegenden Erfindung wurde als Selektionsgen das Neomycin-Resistenzgen verwendet.

Allgemein kann gesagt werden, daß Retroviren in der Regel eine sehr gute Effizienz zeigen, was bedeutet, daß bis zu 100% aller Zellen erreicht werden. Bei Plasmiden dagegen wird nur eine von 1.000 bis 100.000 Zellen transfiziert. Gerade bei Plasmidvektoren ist daher eine Verbesserung der Transfektionseffizienz entscheidend.

In dem vorliegenden Versuch wurden humane Fibroblasten der Linie KMST-6 verwendet. Parallel wurden sie einmal mit den erfindungsgemäßen Vektoren ohne NTS und einmal mit den erfindungsgemäßen Vektoren mit NTS-Sequenz transfiziert. Die Versuche wurden durch Lipofektion durchgeführt. Unter Neomycinselektion wurde dann bestimmt, wie viele unabhängige Kolonien in Zellkultur aus den Ursprungszellen heranwuchsen. Da kurz nach Lipofektion sehr viele Kolonien entstehen, bei denen das Plasmid nicht stabil in das Chromosom integriert wurde (transiente Transfektion), darf erst nach längerer Zeit die Anzahl der Kolonien berechnet werden. Beim vorliegenden Beispiel wurden die Kolonien 14 Tage nach Selektionsbeginn gezählt, wenn die Kolonien aus mehr als 20 Zellen bestanden. Üblicherweise haben diese Kolonien dann das Plasmid stabil ins Chromosom integriert und sie sterben auch unter fortgesetztem Selektionsdruck mit Neomycin nicht mehr ab. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz ist nur ein relativer Parameter, weil es keine Standards für den Selektionsdruck gibt. Es ist also einleuchtend, daß Zellen, die hohe Mengen an Resistenzgenprodukt synthetisieren, auch noch bei höheren Hemmstoffen-Mengen zu überleben vermögen als Zellen, die kaum oder nur wenig Resistenzgenprodukt erzeugen. In einer heterogenen Kultur wird es also immer Zellen mit unterschiedlichen Resistenzniveaus geben, so daß die Transfektionseffizienz immer nur bei einer Hemmstoffkonzentration in derselben Zellgattung vergleichbar ist. Die Unterschiede im Resistenzniveau können aber auch für eine effiziente Selektion ausgenutzt werden.

In dem vorliegenden Beispiel wurden 10<sup>5</sup> KMST-6

Zellen mit 4 µg DNA lipofektiert und danach aufgeteilt. Dann erst wurde die Selektion mit Neomycin begonnen, so daß zumindest die Ausgangsbedingungen für alle Zellen gleich waren. Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abb. 4 und 5 dargestellt.

Diesen Ergebnissen kann man entnehmen, daß die NTS-enhaltenden Vektoren allgemein eine höhere Transfektionseffizienz haben als ihre NTS-losen Gegenstücke. Die NTS-enhaltenden Plasmide führen also nach Transfektion bei jedem Vektor in jedem Versuch zu mehr Kolonien als die NTS-losen Plasmide. Dieses "Mehr" wird umso bedeutender, je höher der Selektionsdruck durch Neomycin ist. Die in Abb. 4 dargestellten Versuche wurden mit dem CMV-Promotor durchgeführt. Die relative Verbesserung der Effizienz liegt zwischen 1,5- und 7fach.

#### Beispiel 2

Die in Abb. 5 dargestellten Versuche wurden mit dem β-Aktin-Promotor durchgeführt. Die relative Verbesserung der Effizienz liegt zwischen 2- und 4fach. Wie erwartet, sind natürlich die scheinbaren Effizienzen mit steigendem Selektionsdruck deutlich geringer als beim Standardwert von 500 µg/ml Neomycin. Der Effizienzunterschied zwischen NTS-enhaltenden und NTS-losen Vektoren ist statistisch signifikant. Zu beachten ist, daß das IRES-Konstrukt bei Selektion mit 500 µg/ml Neomycin eine deutlich höhere Transfektionseffizienz ermöglicht als das klassische Konstrukt (160 gegenüber 260 Kolonien; beide Werte mit NTS). Ohne NTS ist kein Unterschied zu erkennen.

#### Beispiel 3

##### Produktion des Transgens (hier: G-CSF)

In der Praxis ist nicht nur die Transfektionseffizienz bedeutend, viel wichtiger ist die hohe Expression des vom Transgen kodierten Proteins. Bei diesem Versuch wurden die gemäß Beispiel 1 und 2 erzeugten Klone weiterverwendet. Über gut isolierte Kolonien wurden kleine Plastikzylinder gestülpt, die im Zylinder liegenden Zellen isoliert und in neue, abgetrennte Kulturgefäße umgesetzt. Diese Klone wurden so weit expandiert, bis sie etwa eine Fläche von 1 cm<sup>2</sup> bewuchsen. Hierbei wird eine 24-Lochplatte verwendet. Während des Wachstums sezernieren die Zellen laufend das Transgen (hier: G-CSF) ins Kulturmedium, in dem es dann nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis wird das Kulturmedium vollständig von den Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach einem bestimmten Zeitraum, hier 24 Stunden, wird das Medium für die G-CSF-Bestimmung entfernt und dann im ELISA auf den Zytokingehalt hin überprüft.

Um möglichst hohe Expression des Transgens zu erhalten, wurden die transfizierten KMST-6-Zellen bei verschiedenen Neomyzinkonzentrationen selektioniert. Die Verwendung hoher Konzentrationen (bis 3 mg/ml Neomyzinsulfat) sollte den Klonen, die höhere Neo-Resistenz aufbauen konnten, besseres Überleben garantieren. Im Fall des Doppel-RNA-Plasmids beim klassischen Vektor soll die Steigerung der G-CSF-Produktion als Begleiterscheinung auftauchen (hohe Neomyzinresistenz nur bei multiplen Kopien, beim Einbau des Plasmids an besonders günstigen Stellen im Chromosom oder — bei NTS — lokale Aktivierung des Chromosoms nach Einbau des Plasmids). Beim erfindungsgemä-

Ben Konstrukt soll mit Hilfe der Selektion auf hohe Neomyzinresistenz gleichzeitig auch auf hohe Produktion an Transgen (hier: G-CSF) selektioniert werden, da dieselbe RNA ja beide Informationen trägt.

In den Abb. 6 und 7 sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengefaßt. Eine alleinige Erhöhung der Neomyzinkonzentration bei der Selektion der Klone erbrachte keine Erhöhung der G-CSF-Produktion. Die Werte in den Spalten G500 bis G3000 (Abb. 6) gelten für das Doppel-RNA-Plasmid und die Werte βact500 bis βact2000 (Abb. 7) für das erfindungsgemäße IRES-Konstrukt.

In Abb. 6 werden Ergebnisse dargestellt, die mit einem klassischen RNA-Vektor erhalten wurden. Die Abkürzung G bedeutet dabei ohne NTS-Sequenz, wohingegen NG bedeutet: klassischer doppel RNA-Vektor mit NTS-Sequenz. In der oberen Grafik bedeutet dabei G 500: Transfektion mit klassischem Vektor (2 Promotoren) ohne NTS-Sequenz, Selektion mit 500 µg/ml Neomycin, CMV-Promotor. Die Abkürzung NG 500 bedeutet Transfektion mit klassischem Vektor (2 Promotoren) mit NTS-Sequenz, Selektion mit 500 µg/ml Neomycin, CMV-Promotor. Die höheren Zahlen 1000, 2000 bzw. 3000 bedeuten Selektion mit 1000, 2000 bzw. 3000 µg/ml Neomycin.

In Abb. 7 sind Ergebnisse dargestellt, die mit dem erfindungsgemäßen Vektortyp erzielt wurden. Die Abkürzung βact 500 bedeutet dabei Transfektion mit erfindungsgemäßigem Vektor ohne NTS-Sequenz, Selektion mit 500 µg/ml Neomycin, β-Aktinpromotor. Die Abkürzung β + NTS 500 bedeutet Transfektion mit erfindungsgemäßigem Vektor mit NTS-Sequenz, Selektion mit 500 µg/ml Neomycin, β-Aktinpromotor. Die Zahlen 1000 bzw. 2000 geben die Selektion mit 1000 bzw. 2000 µg/ml Neomycin an.

Die Anzahl n = 16 usw. bezieht sich auf die Menge an untersuchten Klonen pro Experiment und belegt die Aussagekraft des Versuches.

Wenn die Vektoren die NTS-Sequenz aufwiesen, konnte eine deutliche Steigerung der Produktion mit steigender Neomyzin-Menge festgestellt werden. In Abb. 6 sind die entsprechenden Vektoren in den Spalten NG500 bis NG3000 dargestellt und in Abb. 7 in den Spalten β + NTS500 bis β + NTS2000. Die NTS-Sequenz scheint einen direkten Einfluß auf die Transkription auszuüben. Der Effekt einer Kopiezahlerhöhung kann fast ausgeschlossen werden, da alle sehr gut produzierenden Klone nur ein bis 2 Kopien pro Genom haben. Dies ist weniger als die durchschnittliche Anzahl der Kopien gemessen an Mischkulturen aus vielen Kolonien, die 7 bis 10 Kopien pro Genom beim Doppel-RNA-Vektor oder 2 bis 3 Kopien beim IRES-Vektor enthalten. Da die Erhöhung der Neomyzinkonzentration allein bei der Selektion keinen positiven Effekt auf die Transgenproduktion hat, könnte eine Erklärung darin gesehen werden, daß die NTS-Sequenz eine lokale Verbesserung der Chromosomenstruktur herbeiführt.

Die beiden Abb. 6 und 7 zeigen deutlich, daß der erfindungsgemäße Vektor eine signifikant höhere G-CSF-Produktion erlaubt als der aus dem Stand der Technik vorbekannte Vektor. Während der Vektor des klassischen Typs ohne NTS im Mittel nur etwa 5 ng/24 Stunden und 24-Lochplatte produziert, liegt der Mittelwert beim erfindungsgemäßen Vektor bei 50 ng. NTS und hoher Neomyzinselektionsdruck erhöhen die Produktion beim erfindungsgemäßen Vektor auf über 100 ng.

Auf der Ebene der Einzelklone erlaubt der klassische Doppel-RNA-Vektor maximal die Produktion von

100 ng/24 Stunden und 24-Lochplatte, der IRES-Vektor aber bis zu 450 ng G-CSF. Nicht berücksichtigt wird hierbei, daß der  $\beta$ -Aktin-Promotor, wie im erfindungsgemäßen Vektor verwendet, nur etwa 50% Aktivität des CMV-Promotors besitzt.

#### Beispiel 4

Um die Expression eines Transgens in den erfindungsgemäßen Vektoren nachzuweisen, wurden verschiedene Vektoren konstruiert, die schematisch in Abb. 8 dargestellt sind. Die dort verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen: CMV = früher Promotor von CMV; IL-2 = cDNA für menschliches Interleukin-2; G-CSF = cDNA für menschlichen Granulocyten-Kolonie stimulierenden Faktor; Neo<sup>r</sup> = cDNA für Neomycin-Phosphotransferase; TK = cDNA für Thymidinkinase von Herpes simplex Virus; IRES = interne Ribosomeneintrittssequenz (von Encephalomyocarditis-Virus); poly A = kleines Intron und Polyadenylierungssignal von Virus SV40; Kinker = "Scharnier". Bei dem Vektor pNeoCMVIL2.3 handelt es sich um einen klassischen Vektor mit zwei Promotoren. Die anderen in Abb. 8 dargestellten Vektorkonstrukte stellen Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Vektors dar. Als Transgen wurde entweder Interleukin-2 oder G-CSF verwendet.

Bei einem Transfektionsversuch wurden Balb3T3 Zellen durch kationische Lipofektion mit den Plasmiden pNeoCMVIL2.3, pCMVIL2iresNEO und pCMV.NEO.iresIL2 transfiziert. Alle Plasmide waren vor der Transfektion durch Verdau mit dem Restriktionsenzym ScaI linearisiert worden. Bei den drei Plasmiden konnte kein Unterschied in der Transfektionseffizienz beobachtet werden. Von jedem Transfektionsansatz wurden zufällig ausgewählt 15 Klone, die stabil transfiziert Resistenz gegenüber G 418 aufwiesen (1 mg G 418 pro ml Wachstumsmedium). Diese Klone wurden auf Selektion von IL-2 untersucht. Es zeigte sich, daß bei den Klonen, die mit Plasmid pCMVIL2iresNEO transfiziert wurden, eine Expression von 348 ( $\pm$  293) internationale Einheiten IL-2 pro 10<sup>6</sup> Zellklone und 24 Stunden aufgefunden wurde, wohingegen die IL-2-Produktion von mit pNeoCMVIL2.3 transfizierten Klonen (herkömmlicher Vektor) deutlich niedriger war (197  $\pm$  299 internationale Einheiten/10<sup>6</sup> Klone  $\times$  24 Stunden).

Ein anderes wichtiges Ergebnis dieses Versuches ist, daß alle mit erfindungsgemäßen Vektoren transfizierten Klone, die neomycinresistent waren, hohe Konzentrationen von IL-2 produzierten, wohingegen drei Klone, die mit herkömmlichem Vektor transfiziert wurden, kein IL-2 produzierten. Neomycinresistenz weisen diese Klone jedoch auf, da sie sonst nicht bei den Selektionsbedingungen hätten wachsen können.

#### Beispiel 5

Zur Überprüfung der in vivo Expression von Transgenen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren wurde menschliches G-CSF ausgewählt, da die Bestimmung von Leukozytenzahlen im peripheren Blut von Mäusen eine einfache Bestimmung der Aktivität des Transgens in vivo erlaubt. Bei den Versuchen wurden hoch aggressive Mäuse-CMS-5-Fibrosarkomazellen mit den Vektoren pCMV.GCSF.iresNEO, pCMV.GCSF.iresTK/NEO bzw. pCMV.GCSF.iresNEO/TK transfiziert. Da das letztgenannte Plasmid nur eine geringe Resistenz gegenüber G 418 vermittelte, wurde es nicht weiter bei

den Versuchen verwendet. Bei den transfizierten Zellen wurde folgende durchschnittliche Sekretion von G-CSF bestimmt:

Bei Zellen transfiziert mit pCMV.GCSF.iresNEO: 1,2 ( $\pm$  1,5) mg/10<sup>6</sup> Zellen  $\times$  24 Stunden und bei pCMV.GCSF.iresTK/NEO: 0,37 ( $\pm$  0,12)  $\mu$ g/10<sup>6</sup> Zellen  $\times$  24 Stunden. Durch Zugabe von Gancyclovir konnte eine deutliche Hemmung des Wachstums der letztgenannten Zellen (mit Thymidinkinasegen) beobachtet werden, wohingegen kaum eine Hemmung bei den Zellen auftrat, die mit pCMV.GCSF.iresNEO transfiziert wurden.

Um die Funktion des chimären Selektionsgenes in vivo zu testen, wurden die wie oben beschrieben transfizierten Zellen Mäusen vom Balb/c Stamm injiziert. Dabei wurden jeweils 2,5  $\times$  10<sup>5</sup> Zellen in je 6 Mäuse injiziert.

Sieben Tage nachdem die transfizierten Tumorzellen injiziert worden waren, wurden jeweils drei Mäuse von jeder Testgruppe 2  $\times$  täglich intraperitoneal mit 15 mg Gancyclovir pro kg Körpergewicht für 18 Tage behandelt. Bei allen Tieren wurde das Tumorstadium und die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut gemessen.

Die Gruppe, die Zellen erhielten, die mit dem Vektor pCMV.GCSF.iresNEO transfiziert worden waren (also ohne Thymidinkinasegen) entwickelte bis auf eine Ausnahme Tumoren und diese Tiere mußten nach 2 Wochen getötet werden. Alle Tiere aus dieser Gruppe, die GCSF-sekretierende Tumoren aufwiesen, die sich unter Gancyclovirbehandlung nicht zurückbildeten, zeigten exponentiell steigende Leukozytenzahlen.

Im Gegensatz dazu bildeten sich alle Tumoren, die das TK/Neo<sup>r</sup>-Fusionsprotein exprimierten, völlig unter Gancyclovirbehandlung zurück, wobei auch die Leukozytenzahl zum Ausgangswert zurückkehrte.

#### Patentansprüche

1. Vektor zur Transfektion von Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Expressionskassette mit mehr als einem Cistron aufweist, die in Richtung vom 5'-Ende zum 3'-Ende folgende Bestandteile aufweist:

- a) wenigstens ein regulatorisches Element;
- b) ein zu exprimierendes Gen;
- c) eine interne Ribosomen-Eintrittssequenz (IRES);
- d) ein Selektionsgen.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das regulatorische Element einen Promotor umfaßt, der ausgewählt sein kann aus der Gruppe bestehend aus CMV-Promotor und  $\beta$ -Aktinpromotor und gegebenenfalls weitere verstärkend wirkende Bestandteile aufweist.

3. Vektor nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu exprimierende Gen ausgewählt ist aus Genen, die kodieren für Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Granulocyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), Granulocyten-Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF), Stammzellfaktor (SCF), Erythropoetin (EPO), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) oder Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

4. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die interne Ribosomen-



eintrittssequenz (IRES) ausgewählt ist aus den internen Ribosomeneintrittssequenzen, die ursprünglich aus Picornaviren oder dem Encephalomyocarditis-Virus herkommen.

5. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektionsgen ausgewählt ist aus Resistenzgenen gegen Antibiotika, insbesondere dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen und dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen.

6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektionsgen umfaßt cDNA des Thymidin-Kinase-Gens von Herpes simplex, fusioniert an DNA, kodierend für Neomycin-Phosphotransferase oder Hygromycin-Phosphotransferase.

7. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor in Transkriptionsrichtung nach dem Selektionsgen einen Genbereich Intron/poly AD aufweist.

8. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor am 3'-Ende des Konstruktes eine NTS-Sequenz aufweist.

9. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskassette zwei Cistrons aufweist.

10. Eukaryotische Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 9 transfiziert wurde.

11. Eukaryotische Zelle nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine humane Zelle handelt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend Fibroblasten, Knochenmarkstammzellen, Vorläuferzellen von weißen Blutkörperchen, Langerhans'sche Zellen und dendritische Zellen.

12. Verwendung von Zellen nach einem der Ansprüche 10 oder 11 zur Expression von Genen in vitro.

13. Verwendung von Zellen nach einem der Ansprüche 10 oder 11 zur Expression von Genen in vivo, wobei die transfizierten Zellen Patienten verabreicht werden und die Zellen das klonierte Gen im Patienten exprimieren.

14. Verwendung von Zellen nach Anspruch 10 zur Expression von Genen in vivo, wobei die Zellen Nutztieren verabreicht werden und die Zellen das klonierte Gen in den Nutztieren exprimieren.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

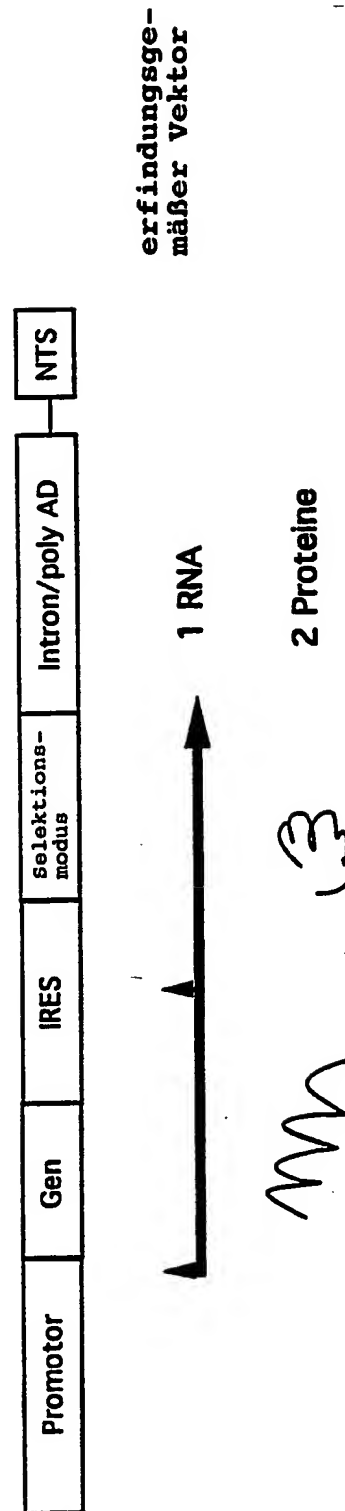
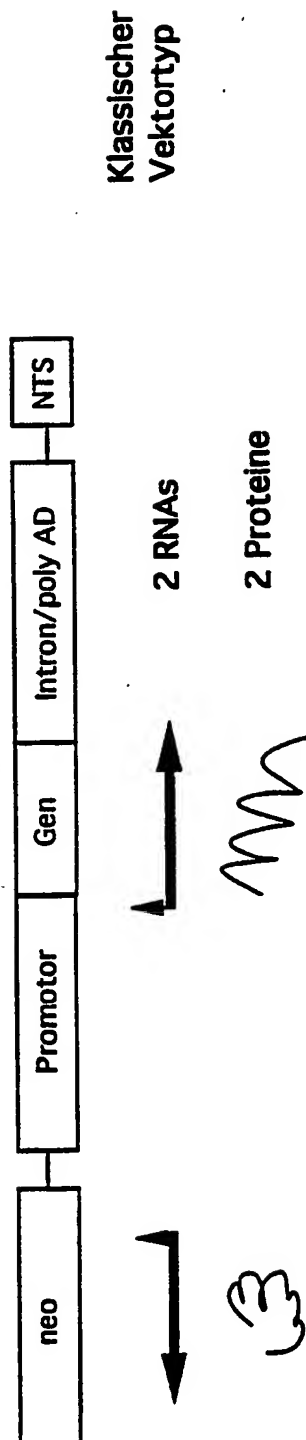
55

60

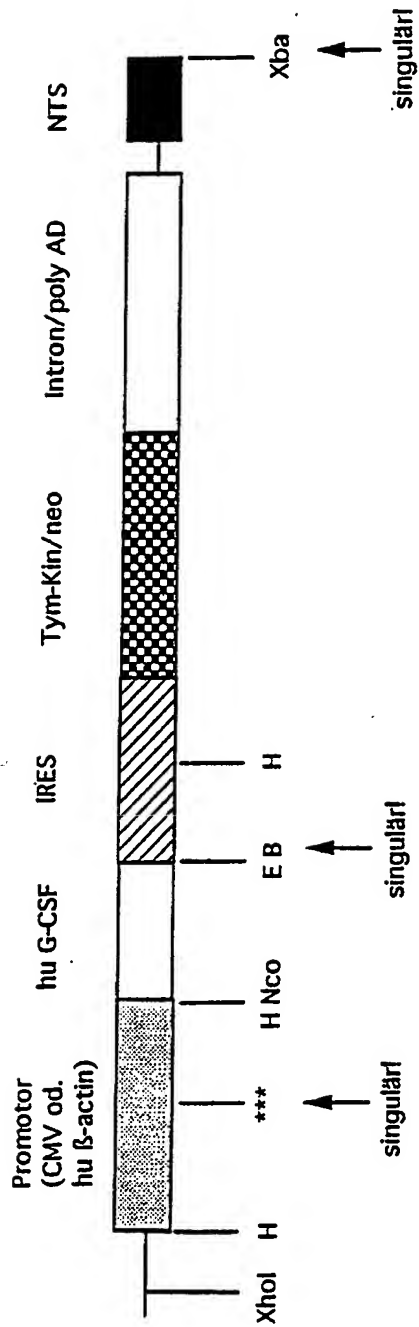
65



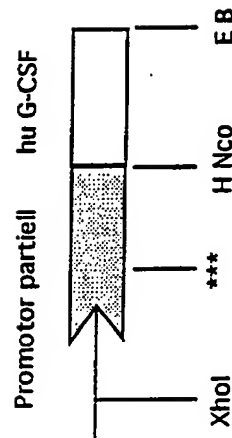
- Leerseite -



**Abb. 1**



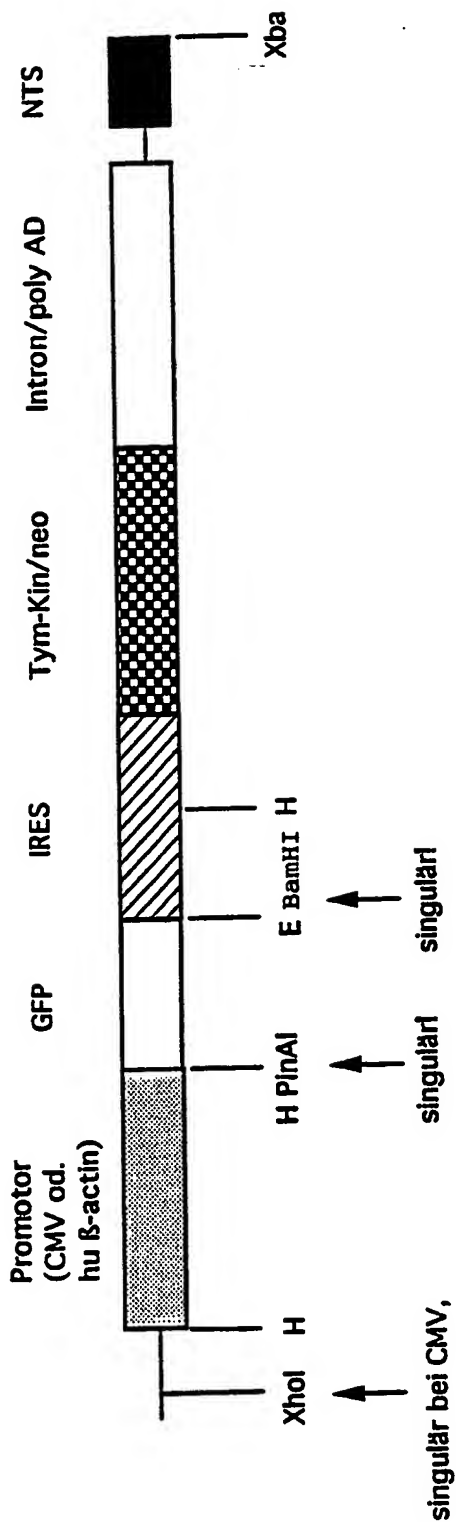
Zum einfachen Klonieren von anderen Genen kann ein Subklon mit folgender Struktur verwendet werden:



im Subklon sind alle Schnittstellen singulär; der Subklon ist damit hervorragend zum Klonieren geeignet

Abb. 2

Abb. 3



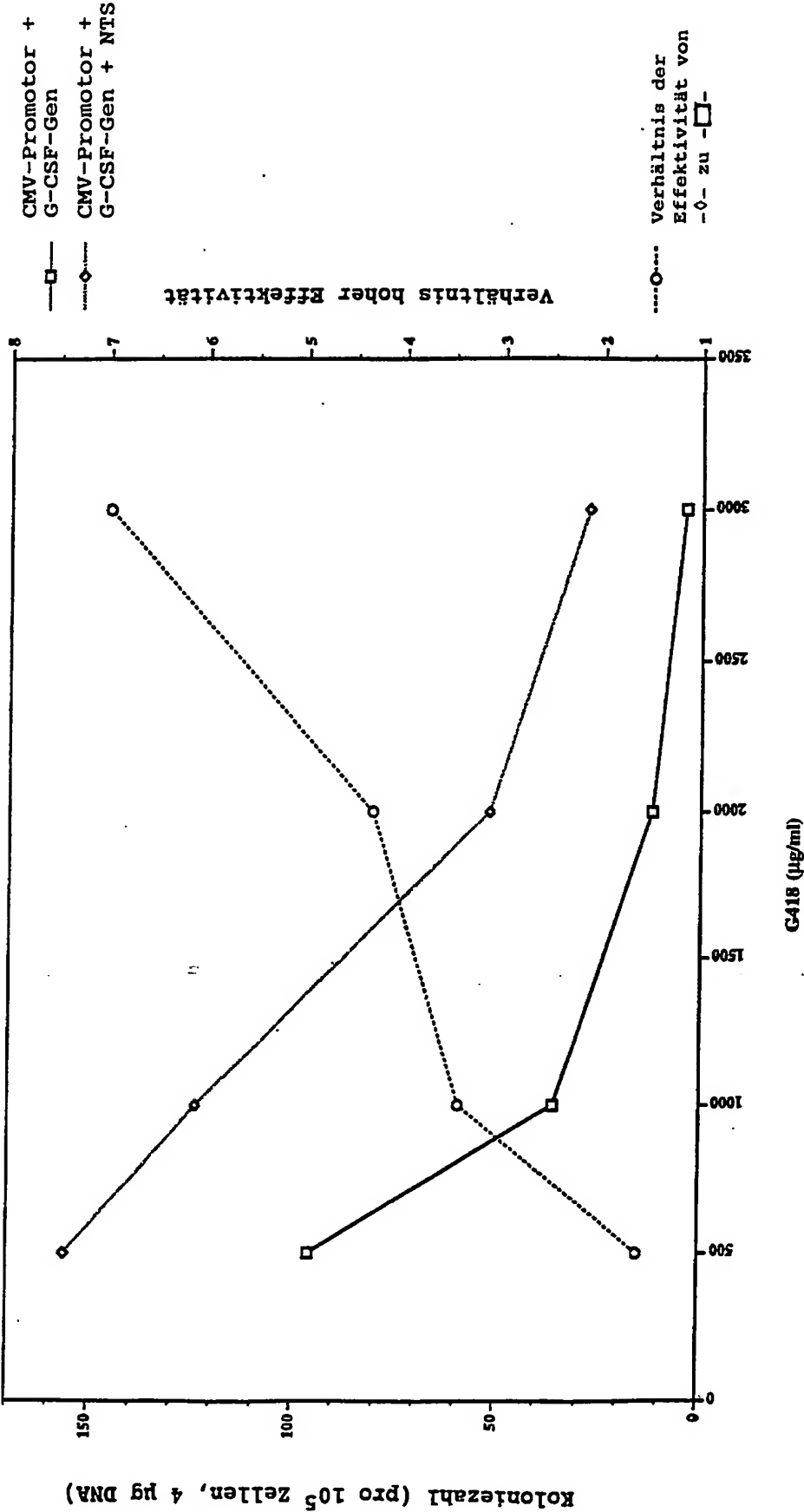


Abb. 4

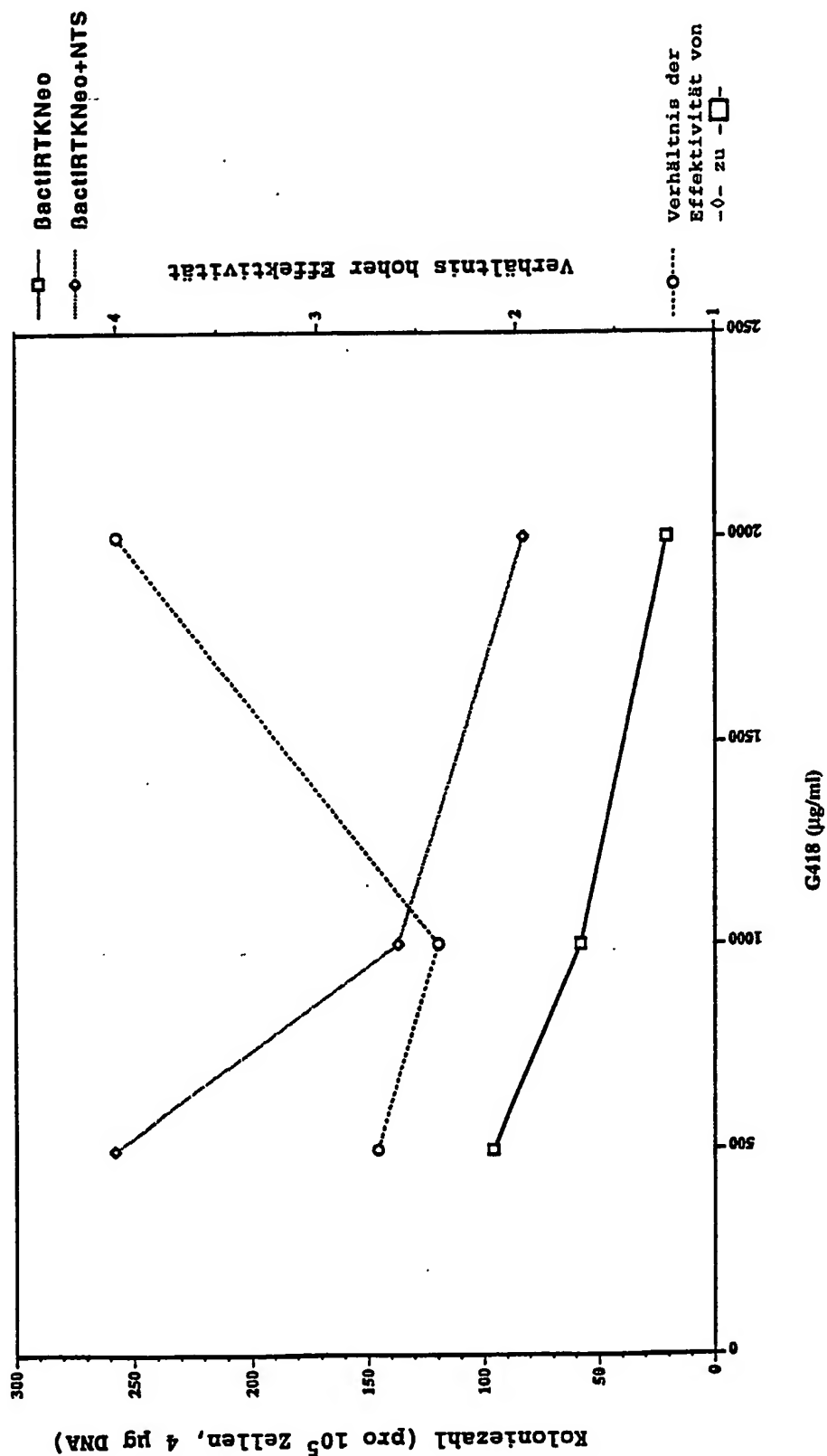
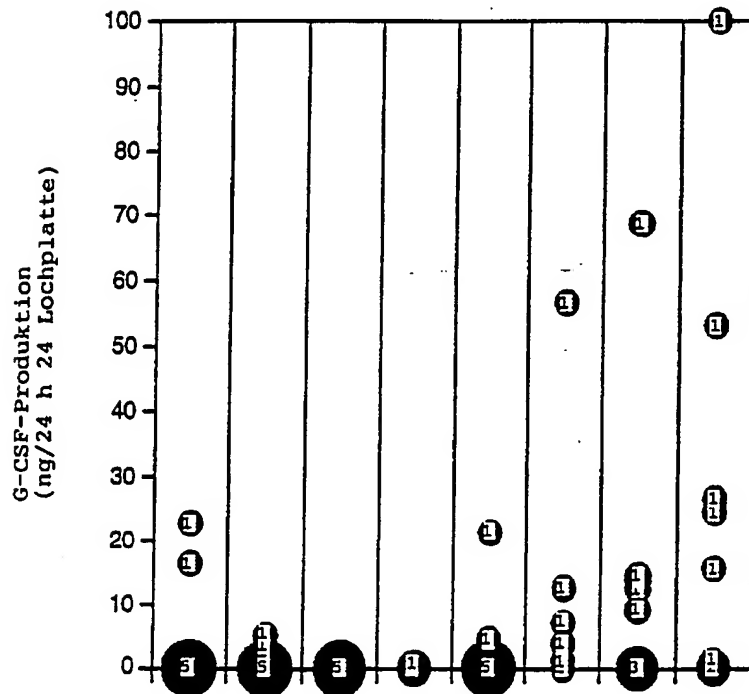
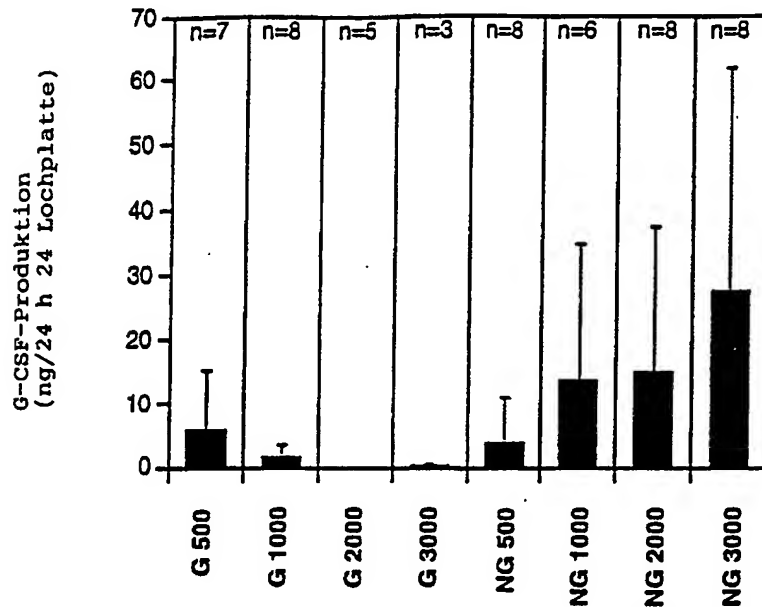


Abb. 5

G-CSF-Produktion in KMST-6 Zellen mit doppel RNA-Plasmid  
mit CMV-Promotor mit und ohne NTS; selektioniert bei  
verschiedenen Neomycin-Konzentrationen



G-CSF-Produktion von ausgewählten Klonen

Abb. 6



G-CSF-Produktion in KMST-6 Zellen mit Plasmid ( $\beta$ -Actin; IRES; Neo<sup>R</sup>) mit und ohne NTS-Sequenz; selektioniert bei verschiedenen Neomycin-Konzentrationen

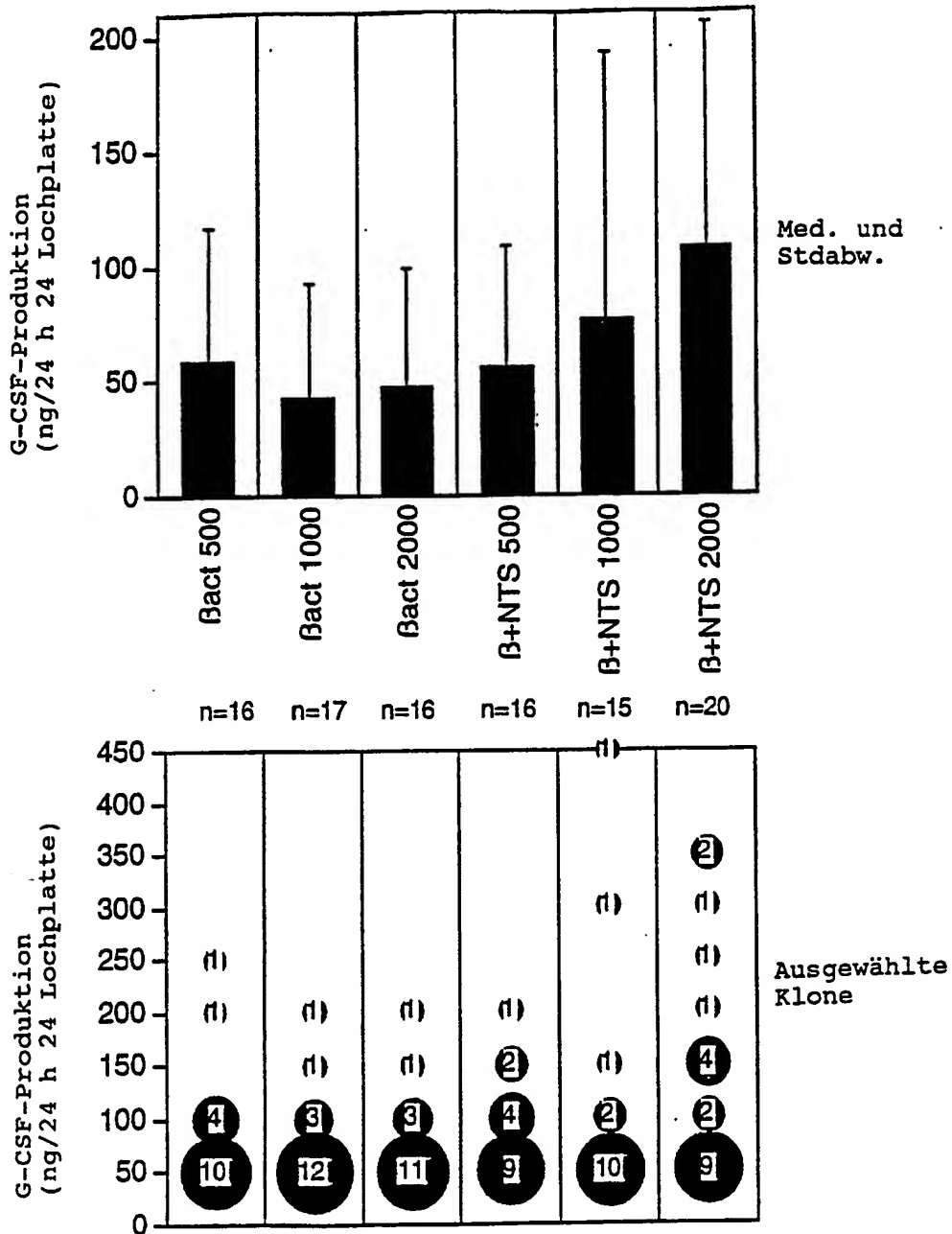


Abb. 7

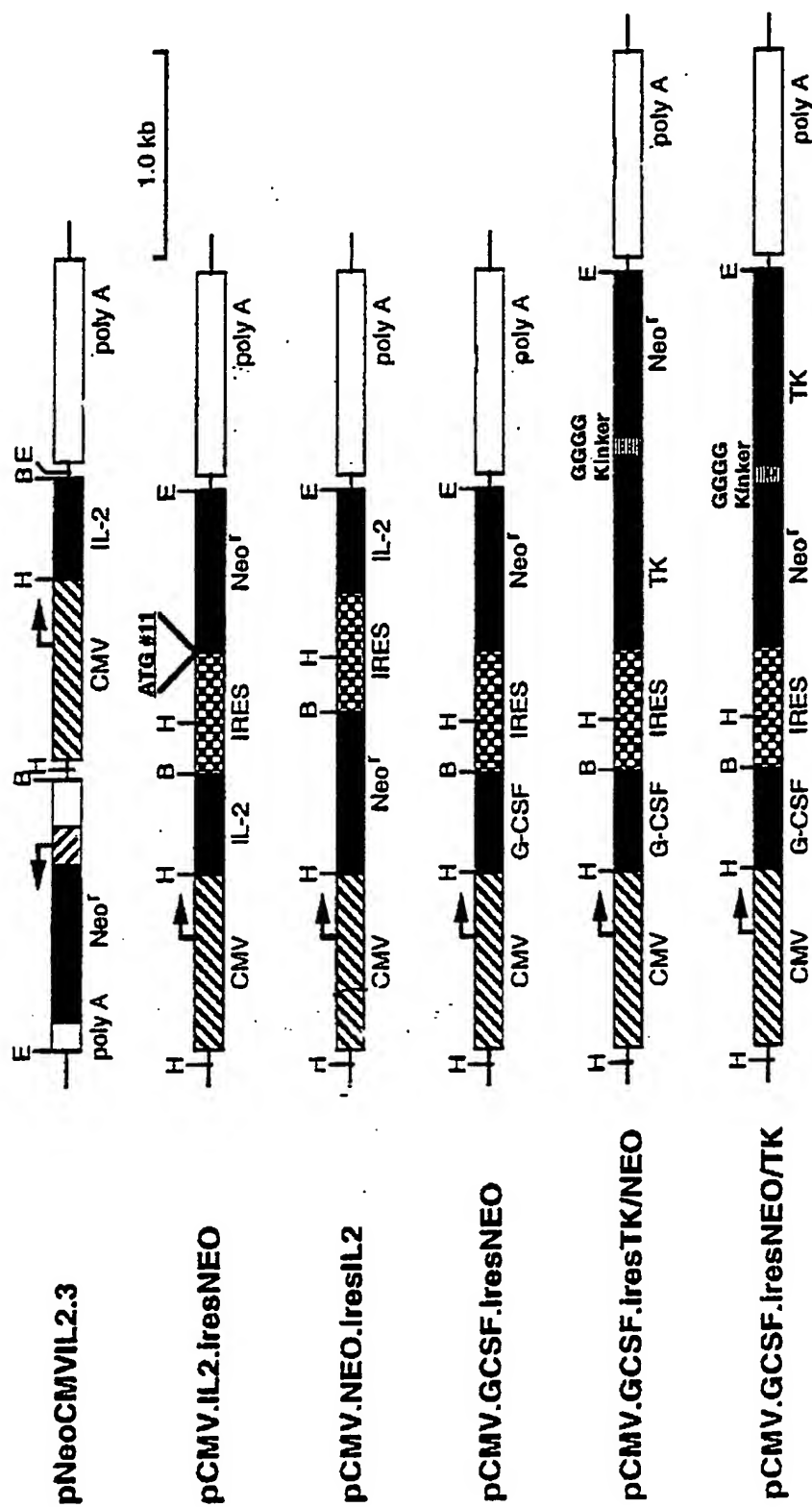


Abb. 8